



## PEME XV. PhD - Konferencia



***TIZENÖT ÉVE AZ EURÓPAI SZINTŰ TUDOMÁNYOS MEGÚJULÁS ÉS A FIATAL KUTATÓK  
SZOLGÁLATÁBAN***

*2017. november 08.*

*BUDAPEST*

A

**15 éves PEME XV. PhD - Konferenciájának előadásai**

(Budapest, 2017. november 08.)

Szerkesztette:

Dr. Koncz István – Szova Ilona



Elektronikus könyv

I. kötet

2017

ISBN: 978-615-5709-02-9

Kiadja a **15 éves** Professzorok az Európai Magyarországért Egyesülete

/Lektorálták: Dr. Kádár Gyula és Dr. Barkóczy Zoltán/

(<sup>1</sup>Institute of Genetics, BRC HAS, Szeged, Hungary)

(<sup>2</sup>Department of Genetics, University of Szeged, Szeged, Hungary)

(<sup>3</sup>Department of Anatomy, Cell and Developmental Biology, Eötvös Loránd University, Budapest, Hungary)

(<sup>4</sup>Doctoral School in Biology, Faculty of Science and Informatics, University of Szeged, Szeged, Hungary)

## Absztrakt

Autofágiának azt a folyamatot nevezzük, amely során a sejt saját anyagai, vagyis a sejtben megtalálható fehérjék és organellumok a lizoszómába kerülnek, majd ott az emésztő enzimek hatására degradálódnak. A sejtbiológiai jelenség rendkívül jelentős kutatási témává vált az utóbbi pár évben, mivel a folyamathoz számos élettani és kóros jelenséget lehet kötni. Munkám során CRISPR/CAS9 módszerrel és géncsapdázással öt *Atg*-re készítettem *null* mutánst *Drosophila melanogaster*-ben: *Atg5*, *Atg9*, *Atg8b*, *Atg8a*, *Atg14*. A mutánsokat más csoportokkal történő kollaborálásra és saját projektekhez használtuk illetve használjuk. A tanulmány ezen projekteket és eredményeit mutatja be és foglalja össze

## Bevezetés

Az autofágia egy eukariotákban erősen konzervált intracelluláris lebontó folyamat. Három fő típusát szokás elkülöníteni az alapján, hogy milyen úton kerül a fagoszóma tartalma a lizoszómába. A fő útvonala folyamán, vagyis makroautofágia során, keletkezik egy membránciszterna, amit izoláló membránnak (fagofórnak) hívunk, amelynek máig nem tisztázott az eredete. Az izoláló membrán körbenövi a citoplazma egy részletét, majd kettős membránnal határolt vezikulává zárul, amit autofagoszómának hívunk. Befejezésül az autofagoszóma fuzionál egy lizoszómával, ezáltal tartalma és belső membránja lebomlik a lizoszómák hidrolitikus enzimeit által. A lebontás útján keletkezett monomereket (aminosavak, zsírsavak) a sejt újra felhasználhatja energetikai, vagy felépítő folyamatokban. A tanulmányban a makroautofágiát csak autofágia néven használom majd.

Egy másik útvonala a mikroautofágia, amely során a lizoszóma membránja betüremkedik, közben magával ragadja a citoplazma egy részét. Végül a betüremkedés lefűződik a lizoszóma lumenében és ott lebomlik annak tartalmával együtt. A jelenség még kevésbé ismert és a jelentősége is sokkal kisebb makroautofágiánál, viszont képes akár organellumok lebontására is. Szabályozását részben a fő útvonalat befolyásoló gének végzik.

A legkisebb jelentőséggel a chaperone-mediálta autofágiának van. Ezen az útvonalon bizonyos fehérjék egy molekuláris transzportrendszer révén a citoszólból közvetlenül a lizoszóma membránon átjutva annak lumenébe kerülnek. A KFERQ aminosav szekvenciával rendelkező, hibás térszerkezetű fehérjék szelektív felismerését a Hsc70 citoszolikus dajkafehérje végzi. Ezt követően a fehérjék a lizoszóma membránban elhelyezkedő LAMP-2A (lysosome-associated membrane protein 2A) molekulák által képzett csatornán keresztül jutnak be a lebontó funkciójú sejtszervecske belsejébe, ahol a lizoszómális Hsc70 fogadja ezeket, majd pedig lebontódnak a savas hidrolázok közreműködésével (Juhász és mtsai 2013).

Az autofágiát ugyanakkor a megemésztett szubsztrátja alapján is fel szokták osztani. Ilyen módon beszélhetünk mitofágiáról (mitokondrium célzott lebontása), pexofágiáról

(peroxiszómák célzott lebontása), retikulofágiáról (Endoplazmatikus retikulummal összefüggő lebontás), ribofágiáról (riboszómák célzott és nem célzott lebontása autofágia által), xenofágia (baktériumok lebontása autofágia által). Ezen kívül számos autofágia típust különítenek el (lásd a lipideket lebontó lipofágiát), amelyek felsorolásától most eltekintenek, viszont megjegyezném, hogy a szubsztrát specifikusságért rendszerint egy ligand-receptor-(néha állványfehérje) komplex felel. *Drosophila melanogaster* modellben leginkább a p62/Ref2 (mint receptor) és lebontandó szubsztrát (mint ligand) ismert. A p62 a fagofor specifikus Atg8-hoz dokkolódik, így biztosítva a szubsztrát specifikus kötődését az autofág struktúrákhoz. Ugyanakkor a p62 ilyen módon szintén egy specifikus szubsztrátjává válik az autofágiának, így autofágia hiányában rendkívül megnő a p62 szintje, amit több féle kísérlettel (pl. Western Blottal) ki lehet mutatni (Jin és mtsai, 2013).

Az autofág struktúrák felfedezését az elektronmikroszkópos technológia megjelenése tette lehetővé. A lizoszómát 1955-ben azonosították elektronmikroszkópon először (De Duve és mtsai, 1955), majd szép lassan elkülönítik a hidrolitikus enzimeket nem tartalmazó, nem savas, autofág struktúrákat és egy kongresszuson de Duve bevezeti az autofágia fogalmát (de Duve, 1963). Ezután majdnem 30 évig viszonylag kevés fontos felfedezés történt a jelenséggel kapcsolatban. Itt érdemes megemlíteni, hogy ebben az időszakban írták le, hogy az inzulin és a magas aminosav szint gátolja az autofágiát (Mortimore és mtsai, 1976), valamint szintén ebben az időszakban felfedezik fel a chaperone-mediálta autofágia jelenségét (Dice és mtsai, 1978). A téma első nagy áttörését az hozta, hogy Yoshinori Ohsumi a tudomány első teljes genomot érintő mutagenézis szűrése során azonosít 15 *Atg* gént (Tsukada és Ohsumi, 1993). Egy évtizednyi várakozás után, a kétezres évek első felében drámaian megnő az autofágia témában leközölt publikációk száma. Ennek folyamánként az *Atg* gének leírásáért tavaly Nobel-díjat ítéltek oda Yoshinori Ohsumi kutatónak, ami önmagában is kihangsúlyozza ezen sejtbiológiai jelenség hihetetlen orvostudományi potenciálját (Toozen és mtsai, 2016).

Élesztő	<i>C. elegans</i>	<i>Ecetmuslica</i>	Lúdfű	Ember
<b><i>Atg8</i></b>	<i>LGG-1</i>	<i>Atg8a</i>	<i>Atg8A</i>	<i>LC3A</i>
-	<i>LGG-2</i>	<i>Atg8b</i>	<i>Atg8B</i>	<i>LC3B</i>
-	-	-	<i>Atg8C</i>	<i>LC3B2</i>
-	-	-	<i>Atg8D</i>	<i>LC3C</i>
-	-	-	<i>Atg8E</i>	<i>GABARAP</i>
-	-	-	<i>Atg8F</i>	<i>GABARAPL1</i>
-	-	-	<i>Atg8G</i>	<i>GATE-16</i>
-	-	-	<i>Atg8H</i>	-
-	-	-	<i>Atg8I</i>	-

**1. Táblázat: A különböző modellekben fellelhető *Atg8* paralógok**

Az *Atg* gének általában komplexekbe tömörülve szokták betölteni a funkcióikat. Az autofágia iniciációjáért *Atg1*/ULK komplex felel, ez a komplex van legelöl az *Atg* fehérjék hierarchiájában. Az *Atg1* egy Ser/Thr kináz. A komplex többi tagja az *Atg13*, az *Atg101* és a *FIP200*. A komplex legfőbb feladata, hogy a főleg TOR fehérje komplex felől érkező jelek alapján elindítsák az autofágiát, odatoborozva és aktiválva az autofágiáért felelős fehérjéket. Az autofagoszómák speciális membránlipidje a foszfatidil-inozitol 3-foszfát (PI3P). Ezért az autofagoszómák kialakulásához szükséges a III osztályú PI3K komplex, amelyik előállítja a PI3P-t, azáltal, hogy foszforilálja a foszfatidil inozitolt az inozitol gyűrű 3-jelzett hidroxilgyökénél. Élesztőben a PI3K komplex négy fehérjéből áll: *Vps34* (katalitikus egység), *Vps15* (állványfehérjeként), *Atg6* (az *Atg1* szubsztrátja) és *Atg14*, amelyről úgy gondoljuk, hogy felel a komplex autofág specifikusságáért. PI3K felhalmozódása létre hoz egy platformot a PI3K kötő

fehérjéknek. Ilyen PI3 kötő fehérje, az Atg18/WIPI és az őt kötő partnere az Atg2. Bár az Atg2-Atg18/WIPI komplexnek még nem ismerjük biztosan a funkcióját az autofágiában, kimutatták, hogy az Atg2-Atg18 komplexnek fontos szerepe van az Atg9 vezikulákban való eloszlásában. Az Atg9 az egyedüli transzmembrán fehérje az autofágia központi proteinek között. Bár az Atg9 funkciója kifejezetten sokat kutattak, mégis rejtélyes maradt a mai napig a tudomány számára. Élesztőben kimutatták, hogy főleg 30-60 nm átmérőjű vezikulákon mutathatók ki. Az emlősknél a transz-Golgi rendszerben és endoszómákban lokalizálódnak. Éhezés indukálta autofágia esetén arra az eredményre jutottak, hogy az Atg9 segíti a transz-golgitól eljutni a membránokat az Atg8-ig. Azt gondolják, hogy az Atg9 legfontosabb feladata, hogy szállítja a szükséges membránmennyiséget az autofágia kialakításához. Az Atg8 egy olyan ubikvitin szerű fehérje, amelyet egy ubikvitinálással analóg komplex konjugál az autofagofor phosphatidyl ethanolamine (PE) molekulájára. Az Atg8 fehérje egy poszttranszlációs módosuláson esik át, amelyet az Atg4 cisztein proteáz végez, úgy hogy lehasítja a C-terminushoz közeli glicint követő aminosavakat, amely ezután már képes lesz a PE-hoz való kötődéshez. Az Atg8 konjugáló komplex rendelkezik egy E1 (Atg7), E2 (Atg3), és egy E3 (Atg5, Atg12 és Atg16 fehérjékből álló komplex, amely létrejöttében az Atg7 és Atg10 segítkezik) funkciójú elemekkel. Az autofagoszóma külső membránján található Atg8 fehérjét szintén az Atg4 hasítja le, így azokat újra fel tudja használni a sejt. A belső membránon lévő Atg8 a membránnal együtt lebomlik a lizoszómában. Bár ubikvitin és az Atg8 fehérjék között nem valószínűsíthető a közvetlen evolúciós kapcsolat, viszont a fehérje konformációjuk jelentős hasonlóságot mutatnak. Míg pékélesztőben (*Saccharomyces cerevisiae*) csak egy *Atg8* gén van, addig a többsejtű eukariótákban általában több is van, például emlősökben hét *Atg8* gént is azonosítottak, amelyek nagymértékű redundanciát mutatnak, ami nagyon nehézé teszi a vizsgálatukat. *Drosophila melanogaster*-ben mindössze két *Atg8* gént írtak le: az *Atg8a*-t és az *Atg8b*-t (lásd még az 1. Táblázatot), (Bento és mtsai, 2016).

Ez az *Atg* gének által szabályozott katabolikus útvonal igen fontos szerepet játszik az eukarióta sejtekben: a makromolekulák és sejtorganellumok turnover-t biztosítva lassítja az öregedést, míg éhezés és egyéb stressz esetén az élőlény túléléséhez elengedhetetlen. Több neurodegeneratív megbetegedésekkel (Parkinson-, Alzheimer-kór), anyagcsere megbetegedésekkel (II. típusú diabétesz), gyulladásos megbetegedésekkel (Chron betegség), sejt immunválasz meghibásodásával, valamint a tumoros megbetegedésekkel is hozták kapcsolatba az autofágiát.

Vizsont ezen betegségek ilyen irányú kezeléséhez szükség van az autofágiát befolyásoló gének pontosabb ismeretére komplexebb modellorganizmusokban is. A *Drosophila Atg* (autophagy-related genes) gének molekuláris genetikai, sejt- és fejlődésbiológiai vizsgálatával fényt deríthetünk a géntermékek funkciójára.

## Anyag és módszertan

Kutatásainkhoz leginkább az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) modellorganizmust használjuk. Számos előnye közül kiemelném a könnyű és olcsó tarthatóságát, az elérhető genetikai eszköztárak bőségét, valamint több speciális élettani jelenséget, ami miatt jól tanulmányozható az autofágia ecetmuslicában.

A mutagenézis során fontos, hogy az újonnan elkészült mutáns allélok a meiotikus rekombináció során ne veszítsük el. Ehhez ballanszer kromoszómákat használunk. A ballanszer kromoszómák funkciójuk betöltéséhez három tulajdonsággal kell, hogy rendelkezzenek. Először is nagyon fontos, hogy képtelenek legyenek a meiotikus rekombinációra, amelyet a szinte egész kromoszómát átfogó többszörös inszerciók biztosítanak. Másodszor fontos, hogy meg lehessen

különböztetni a mutációt és/vagy transzgént hordozó kromoszómától, amit úgy oldanak meg, hogy egy domináns marker-mutációt tesznek a ballanszer kromoszómára. Végül fontos, bár opcionális, hogy a ballanszer kromoszóma homozigóta letális legyen, hogy így ne szorítsa ki az általa hordozott mutációt. Az általam használt ballanszereket és tulajdonságait a 2. táblázatban foglaltam össze.

Ballanszer típusa	Érintett kromoszóma	Domináns marker-mutáció	Fenotípusa
<b>FM7, GFP</b>	X. (első) kromoszóma	Bar (B), GFP	Vese alakú szemek
<b>CyO, SM6</b>	2. kromoszóma	Curly (Cy), GFP	Felfelé kunkorodó szárny
<b>TM3</b>	3. kromoszóma	Stubble (Sb)	Rövid szőrzet
<b>TM6</b>	3. kromoszóma	Humeral (Hu), Tubby (Tb)	3-5 szőr a tor oldalán, rövid zömök test

## 2. Táblázat: A kísérleteim során felhasznált ballanszer kromoszómák

A CRISPR/CAS9 mutagenézishez actin5c-Cas9 transzgénikus törzset használtuk a Cas9 forráshoz. A gRNS párokat mi generáltuk pBFv-U6.2B plazmid felhasználásával a Kondo és Ueda 2013-s cikke alapján. A géncsapdázást Atg8a<sup>MI13726</sup> vonal felhasználásával valamint Diao és mtsai, 2015 alapján készült el. A mutánsokat minden esetben PCR screeneléssel és p62 ellenanyaggal készült Western blottal azonosítottuk. Klóngeneráláshoz a hs-Flp[22]; QUAS-mCD8-GFP[5J]; ET49-QF, FRT82B tub-QS[21]/TM6 és a hs-Flp[22]; FRT42A tubQS; et49 QI, QUAS GFP/ST6 törzseket használtuk. Klóngeneráláshoz hő sokkoltunk 4 órás petéket, majd háromnapos lárvákat gyűjtöttünk belőlük és három-négy órás éheztetés után kiboncoltuk a lárvális zsírtesteiket. Bizonyos esetekben 100 nM LTR-t használtunk a sejt savas kompartmentumainak azonosításához, amit foszfát puffer sóoldatban (PBS) oldottunk föl.

Fertilitási teszthez egy mutáns 12 óra idős hemizigóta hímet használtunk keresztezésenként, amihez három szűz W<sup>1118</sup> nőtényt használtam fel. Ezeket párhuzamosan bekereszteltük a vad típusú hím kontrollokkal együtt. A petéztetést 5 napig hagytam majd újabb tíz nap múlva megszámláltam a bábokat.

Western blot kísérleteink módszerét már korábban leírtuk (Pircs és mtsai, 2012). A kísérlethez a következő ellenanyagokat használtuk: egér anti-tubulin (1:2000), nyúl anti-p62 (1:5000), nyúl anti-Atg8a (1:5000). Másodlagos ellenanyagként alkalikus foszfatáz enzimmel konjugált ellenanyagokat használtunk: anti-nyúl és anti-egér (1:5000; EMD Milipore).

## Eredmények és kiértékelés

Eddigi munkám során egy új *in vivo* CRISPR/CAS9 módszer felhasználásával négy olyan autofág génre sikerült mutánst előállítani, amelyekről eddig semmilyen null mutáns nem volt elérhető (Atg5, Atg9, Atg14, Atg8b) és készült egy pont mutáns is az Atg101-es génre. Kísérleteim során egy Cas9 endonukleázt transzgénikusan kifejező *ecetmuslica* vonalat saját készítésű, a kiütni kívánt génre specifikus, gRNS-t kifejező transzgénikus vonalat kereszteztünk össze. Ezek nagyszámú utódaiból Western blot és PCR kísérletekkel, valamint letalitásuk megfigyelésével szűrtük ki a mutációt hordozó legyeket. Közben bioinformatikai módszerekkel és Western blot kísérletek (1. ábra) segítségével rájöttünk, hogy egy másik génre, az Atg8-ra, sem áll rendelkezünk jól működő *null* mutáns. Ezen génre rendelkezésünkre állt egy olyan minosz elemes vonal, amelyben a minosz elem a gén intronjában foglalt helyet, ezáltal nem okozott jelentős kárt a génkifejeződésben. Genetikai módszerekkel kicseréltük ezt az elemet egy vírusos exonnal rendelkező Trojan-Gal4 kazettára, amely így már géncsapdaként funkcionálva

teljesen kiütötte a gént. Ezeket a mutánsokat külföldi csoportokkal történő együttműködésekre és a saját kutatási projekteinkhez használtuk fel.

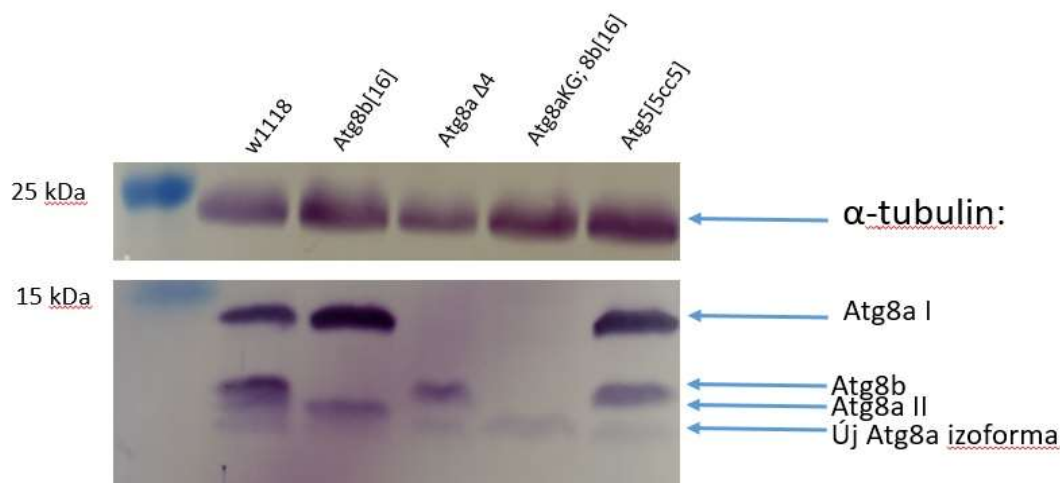
Az *Atg5* mutánsnak fontos szerepe volt egy Michigan egyetemi csoporttal való együttműködésben. Egy török testvérpárnál, akik öröklődő ataxiában szenvednek azt találták, hogy egy misszensz mutáció van az *Atg5*-ös génükön. Arra voltunk kíváncsiak, hogy ez a pont mutáció okozza-e ezt a mozgásszervi és idegrendszeri betegséget. *Drosophilában* az autofágia sérülése redukálja a mozgásképesiséget, amit jól ki lehet mutatni mászóteszten. Az életképes *Atg* mutáns imágók ezért kimutathatóan rosszul mozognak. Mutáns *Atg5* muslica háttérén expresszáltuk az emberben ataxiát okozó pontmutáns *Atg5*-ös allélt, amely nem volt képes menekíteni az *Atg5* mutáns muslica mozgását. A kísérlet kontrolljaként expresszáltattunk humán vad típusú *Atg5* gént amely viszont menekítette az *Atg5* mutáns muslica mozgáshibáját. Ezzel sikerült igazolni, hogy az *Atg5* pontmutáns okozza a vizsgált humán ataxiát, amely eredményt a rangos eLife tudományos folyóiratban közzétük le tavaly (Kim és mtsai, 2016).

Az *Atg14* a Vps34 lipid kinázkomplex tagja. A mutánt először jellemeztem az autofágiában betöltött szerepe alapján. Western blot vizsgálattal megnéztem a p62 szintjét, amin azt találtam, hogy erősen halmozza az autofágia specifikus szubsztrátjaként szolgáló fehérjét, ellentétben a kontrollként használt vad típusú és az *Atg14*-et transzgenikusan kifejeztetett menekítő vonalakkal, amelyek nem halmozták a p62-öt. A komplexben az UVRAG és az *Atg14* kompetitorként viselkednek. Viszonylag elfogadott, hogy az *Atg14* a komplexet autofág, míg az UVRAG endoszóma specifikussá teszi a komplexet, bár még mindig sok a bizonytalanság a modellel kapcsolatban. Több humán sejtvonalban az UVRAG is részt vett az autofágiában (Itakura és mtsai, 2008). A birtokunkban lévő UVRAG mutánssal és az újonnan elkészült *Atg14* mutánssal zsírtestekben klónokat generáltunk, valamint GFP taggelt FYVE (a Vps34 által foszforilált PI3P-hez kötődik) mintázatát vizsgáltuk. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a nem éhező (főleg endoszómák foszforilálódása figyelhető meg ilyenkor a sejtben) UVRAG mutáns klónsejtekben nincsenek FYVE-GFP pontok. Míg a nem éhező *Atg14* mutáns sejtekben sok FYVE-GFP pontot azonosítottunk. Ugyanakkor éheztetett (ilyenkor az autofágia szintje erősen megemelkedik és az autofagoszómák foszforilálódása dominál) állatok UVRAG klónsejtjeiben magas a FYVE-GFP pontok száma, míg az ilyen *Atg14* klónsejtek FYVE-GFP szintje jelentősen lecsökken. Ezen felül a Western blot kísérleten p62 ellenanyaggal csak az *Atg14* mutáns egyedekben észlelhető p62 felhalmozódás, aminek a szintje autofágia defektus esetén nő meg. Eredményeink alapján tisztán elkülöníthető az *Atg14* kizárólag autofágiában betöltött szerepe, míg az UVRAG-ról elmondható, hogy a kinázkomplex endoszóma specifikussá tételében játszik szerepet és a két fehérje szerepe nem fed át egymással. Eredményeinket tavaly közzétük a MBOC lapban (Hegedűs és mtsai, 2016).

Az *Atg9* talán az egyik legérdekesebb és legkevésbé ismert *Atg*. Ez az egyedüli teljesen transzmembrán *Atg* fehérje és ez az egyedüli *Atg*, amely null mutáns allélja erős nőstény sterilítást okoz, viszont az imágó életképes. A mutánsnak rendkívül megrövidül az életideje, jelentősen csökken az oxidáló szerekkel és a fertőzésekkel szembeni ellenálló képessége, valamint erősen romlik az imágó mászó képessége is. Ezeket a fenotípusokat alapvetően az autofágia szintjének csökkenése okozza, ugyan is a zsírtestekben generált mutáns szomatikus klónsejtekben lysotracker vitális festésekor jelentősen lecsökken a savas kompartmentumok száma, valamint ugyan ezen klónsejtekben lecsökkent a 3xmCherry-*At8a* riporter szintje, valamint megnőtt a GFP-p62 riporter szintje. Western blot kísérletben jelentősen halmozta a mutáns a p62 fehérjét. Ezen kísérletek egyértelműen igazolják az *Atg9* hangsúlyos szerepét az



autofágiában és az elkövetkezendő hónapokban azon leszünk, hogy megfejtjük a nőstény fertilitásában betöltött szerepét.



**1. ábra:** Atg8a és Atg8b Western blot pán-anti-Atg8-al testis mintából.

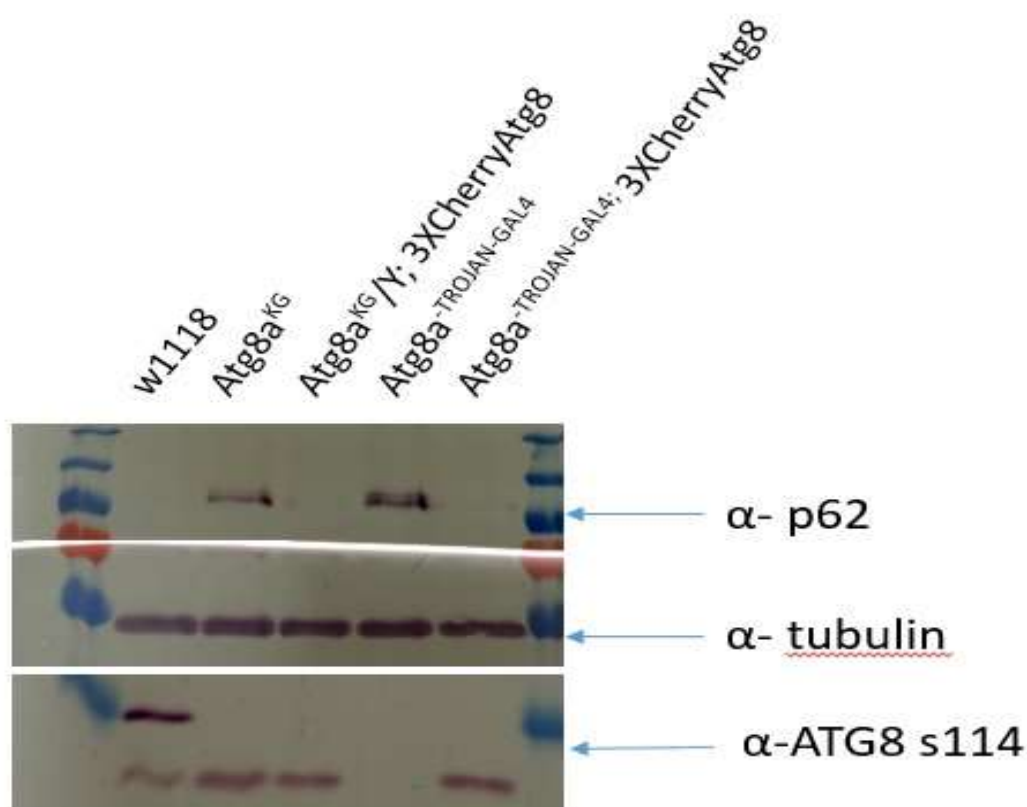
Az *Atg8* az egyik legismertebb és kutatásokban leginkább használt Atg. *Drosophilában* mindössze két *Atg8* gént írtak le: az *Atg8a*-t és az *Atg8b*-t. A két fehérje 62% aminosav szekvencia azonosságot mutat. Az újonnan előállított *Atg8a null* mutánst alaposan jellemeztünk. A mutáns késő báb letalitást mutat és Western blot kísérleten erősen halmozza a p62-öt, valamint Atg8a ellenanyaggal nem mutat semmilyen jelet (3. ábra). Ezzel párhuzamosan megvizsgáltuk az Atg8b deléciós mutánsunkat is, amely erős hím sterilitást mutat (2. ábra). A mutáns hímivarsejtek kifejlődnek ugyan, de mozgásképtelenek. A hímivarsejtek nem mutatnak semmilyen citológiai elváltozást, sem elektronmikroszkópos sem fénymikroszkópos felvételeken. Génről készült egy endogen promoteres GFP jelölt transzgén is. Ebből kiderült, hogy az Atg8b kizárólag ivarvonal kifejeződést mutat és főleg a spermatidákban valamint a flagellumokban van jelen. Valamint 3xmCherry-Lamp1 (lizoszóma specifikus) és 3xmCherry-Atg8a (autofág-struktúra specifikus) riporterekkel való együttes kifejeztetésével nem mutatnak kolokalizációt. Mivel az Atg8b mutánsok Western bloton nem mutatnak p62 felhalmozódást, ezért elmondhatjuk, hogy *Drosophilában* csak egy autofág funkciójú *Atg8* gén van, ami egyedülálló módon a többsejtű modellorganizmusok között, kiváló modellé teszi az autofágia vizsgálatában. Továbbá sikerült az Atg8b riportert egy cisz-Golgi markerrel kolokalizálni. Viszont az eddig riporternak használt transzgén nem képes menekíteni a mutánst, ezért tervezünk egy új Flag tagges konstrukciót ami remélhetőleg képes majd menekíteni a mutánst. Jövőben tervezzük az Atg8b pontos sejtbioológiai funkciójának a vizsgálatát. Ehhez szeretnénk egy működő transzgénnel egy tömegspektrometriás vizsgálatot valamint egy RNS szekvenálást a testisben.





**2. ábra:** Az Atg8b[16] és a vad típusú kontrolljának a fertilitása.

Amint a kísérleteinkből is kiderült, az autofágiának hatalmas jelentősége van a különböző neurodegeneratív megbetegedésekben. Ezen vizsgálatokat rendkívül könnyű muslicákban véghezvinni, ezért nagy jelentősége van a jól leírt betegségmodelleknek. Ezen kívül az eredményeink olyan alkalmazott kutatásoknak ágyazhatnak meg, amelyek potenciálisan komoly terápiás módszerek és gyógyszer-célpontok kifejlesztéséhez járulhatnak hozzá.



**2. ábra.** Inszerciós és az új Atg8a géncsapda Western blot tesztje. Látható, hogy halmozza a p62-öt és semmilyen jelet nem ad az Atg8 ellenanyaggal.

#### ***Irodalomjegyzék:***

- De Duve, Christian, et al. "Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue." *Biochemical Journal* 60.4 (1955): 604.

- De Duve, Christian. "The lysosome concept." Ciba Foundation Symposium-Lysosomes. John Wiley & Sons, Ltd, 1963.
- Mortimore, GLENN E., and WALTER F. Ward. "Behavior of the lysosomal system during organ perfusion. An inquiry into the mechanism of hepatic proteolysis." *Frontiers of biology* 45 (1976): 157-184.
- Dice, J. Fred, et al. "General characteristics of protein degradation in diabetes and starvation." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 75.5 (1978): 2093-2097.
- Tsukada, Miki, and Yoshinori Ohsumi. "Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*." *FEBS letters* 333.1-2 (1993): 169-174.
- Tooze, Sharon A., and Ivan Dikic. "Autophagy captures the Nobel prize." *Cell* 167.6 (2016): 1433-1435.
- Kim, M., Sandford, E., Gatica, D., Qiu, Y., Liu, X., Zheng, Y., Jipa, A., ... & Kim, B. (2016). Mutation in ATG5 reduces autophagy and leads to ataxia with developmental delay. *Elife*, 5, e12245.
- Hegedűs, K., Takáts, S., Boda, A., Jipa, A., Nagy, P., Varga, K., & Juhász, G. (2016). The Ccz1-Mon1-Rab7 module and Rab5 control distinct steps of autophagy. *Molecular biology of the cell*, 27(20), 3132-3142.
- Juhász G., Kovács A., László L., Löw P. (2013) Az önmérsztés, sejtpusztulás és megújulás molekuláris sejtbilógiája. Eötvös Loránd Tudományegyetem, Budapest.
- Jin, Meiyang, Xu Liu, and Daniel J. Klionsky. "SnapShot: selective autophagy." *Cell* 152.1 (2013): 368-368.
- Bento, Carla F., et al. "Mammalian autophagy: how does it work?." *Annual review of biochemistry* 85 (2016): 685-713.
- Itakura, Eisuke, et al. "Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG." *Molecular biology of the cell* 19.12 (2008): 5360-5372.
- Kondo, Shu, and Ryu Ueda. "Highly improved gene targeting by germline-specific Cas9 expression in *Drosophila*." *Genetics* 195.3 (2013): 715-721.
- Diao, Fengqiu, et al. "Plug-and-play genetic access to *drosophila* cell types using exchangeable exon cassettes." *Cell reports* 10.8 (2015): 1410-1421.
- Piracs, Karolina, et al. "Advantages and limitations of different p62-based assays for estimating autophagic activity in *Drosophila*." *PloS one* 7.8 (2012): e44214

## Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni Dr Juhász Gábor témavezetőmnek a sok munkáját és türelmét. Köszönetet szeretnék mondani az ELTE Juhász lab csoportnak és az MTA-SZBK Lendület *Drosophila* Autofágia Kutatócsoportnak. Külön szeretném megköszönni Sinka Ritának és csoportjának a segítségét a *Drosophila* testis vizsgálatában.

A tanulmányban szereplő vizsgálatokat a következő pályázatokból finanszíroztuk: Lendület LP-2014/2, GINOP-2.3.2-15-2016-00006, GINOP 2.3.2.-15-2016-00032, OTKA 119842.